Ontwerp, technologie en evaluatie van een microfluïdische chip voor ‘point of care‘- diagnose van biomarkers voor het botmetabolisme

Design, Technology and Evaluation of a Microfluidic Chip for Point-of-Care Diagnosis of Bone Turnover Biomarkers

Patricia Khashayar

Promotoren: Prof. Dr. Ir. Jan Vanfleteren, Prof. Dr. Ir. Ghassem Amoabediny, Prof. Dr. Bagher Larijani, Dr. Ir. Rik Verplancke
Adviseur: Prof. Dr. Ir. Morteza Hosseini

Proefschrift ingediend tot het behalen van de graad van Doctor in de Ingenieurswetenschappen: Biomedische ingenieurstechnieken (Universiteit Gent) & Doctor in de Ingenieurswetenschappen: Nanobiotechnologie (Universiteit van Teheran)
Academiejaar: 2015-2016

Universiteit Gent
Faculteit Ingenieurswetenschappen en Architectuur, Centrum voor Microsysteemtechnologie (CMST)

Universiteit van Teheran
Faculteit Nieuwe Wetenschappen en Technologie, Departement Biologische Wetenschappen

Universiteit Gent
Faculteit Ingenieurswetenschappen en Architectuur, Centrum voor Microsysteemtechnologie (CMST)

Universiteit van Teheran
Faculteit Nieuwe Wetenschappen en Technologie, Departement Biologische Wetenschappen

Promotoren: Prof. Dr. Ir. Jan Vanfleteren
Prof. Dr. Ir. Ghassem Amoabediny
Prof. Dr. Bagher Larijani
Dr. Ir. Rik Verplancke
Adviseur: Prof. Dr. Ir. Morteza Hosseini

Universiteit Gent
Faculteit Ingenieurswetenschappen en Architectuur
Centrum voor Microsysteemtechnologie (CMST)
914 Technologiepark, B-9052 Zwijnaarde, België

Tel.: +32-9-264.53.60
Fax.: +32-9-264.53.74

Dit werk kwam tot stand in het kader van een specialisatiebeurs van het Universiteit Gent als een gezamenlijk doctoraat met de Universiteit Teheran.

Proefschrift ingediend tot het behalen van de graad van
Doctor in de Ingenieurswetenschappen: Biomedische ingenieurstechnieken (Universiteit Gent)& Doctor in de Ingenieurswetenschappen: Nanobiotechnologie (Universiteit van Teheran)
Academiejaar: 2015-2016

چکیده

تشخیص پوکی استخوان، که امروزه با استفاده از سنجش تراکم مواد معدنی استخوان (BMD) صورت می گیرد، از محدودیت های متعددی رنج می برد. به همین دلیل به نظر می رسد استفاده از مارکرهای استخوانی (BTMs) می توانند در بهبود تشخیص پوکی استخوان کمک کننده باشند. استفاده از BTMs در مقایسه با BMD و ابزار ارزیابی ریسک بالینی، نه تنها در پایش روند درمان بلکه در شناسایی افراد در معرض خطر شکستگی، از مزایای متعددی برخوردار است. این در حالی است که ارزش تشخیصی BTMs در پیش بینی پوکی استخوان پایین بوده و به این ترتیب اندازه گیری همزمان چند BTMs با دقت بالا برای غلبه بر این محدودیت لازم می باشد.

با وجود پیشرفت های اخیر در پروتئومیکس و پزشکی فردی (personalized medicine)، فن آوری های موجود برای اندازه گیری BTM، مانند سنجش ایمونوسوربنت متصل به آنزیم (ELISA) و الکتروکمی لومینسنس (ECLIA)، نه تنها وقت گیر و پر زحمت بوده بلکه به برچسب های خاص و ابزار گران نیاز دارد. با توجه به این محدودیت های آشکار، تمرکز مطالعات مرتبط با سلامت در سالهای اخیر به سمت توسعه و ساخت حسگرهای زیستی نقطه مراقبت (POC) بدون برچسب، قابل حمل، قابل استفاده مجدد و در عین حال قابل استفاده برای اندازه گیری همزمان چند مارکر به ویژه برای تشخیص و نظارت بیماریهای مختلف می باشد. این دستگاه ها که همچنین به عنوان دستگاه های تشخیصی در محل (on-the-spot) نیز شناخته می شوند، باید ساده، حساس، سریع، اختصاصی، ارزان و با قابلیت تفسیر آسان باشند.

به همین صورت، تقاضا برای ساخت حسگرهای زیستی ارزان قیمت و مینیاتوری جهت ارزیابی روند بازسازی استخوان با دقت بالا رو به رشد می باشد. با توجه به بررسی های انجام شزه، تاکنون، هیچ یک از حسگرهای زیستی استخوان موجود در این زمینه موفق نبوده اند.

یک بیوسنسور کارآمد به اتصال انتخابی/اختصاصی ماده شناساگر با آنالیت هدف و همچنین مبدل مناسب برای نشان دادن فرآیند اتصال براساس زمان پاسخ، نسبت سیگنال به نویز (S/N) و حد پایین تشخیص (LOD) نیاز دارد.

در این پروژه، گزارش ساخت یک میز پروتئومیک میکروسیالی که به راحتی قابل تبدیل به یک دستگاه تشخیص برای هر نشانگری (biomarker) می باشد ارائه شده است. این پلت فرم حاصل ادغام تکنولوژی میکروسیالی با سیستم سنجش الکتروشیمیایی بوده و از یک محفظه واکنش/تشخیص برای اندازه گیری سطح سرمی نشانگرهای زیستی متفاوت تشکیل شده است. طراحی منحصر به فرد این پلت فرم امکان اندازه گیری نشانگرها با حساسیت بالا را فراهم می آورد و ساختارهای میکروسیالی و الکتروشیمیایی به طور مستقل قابل بهینه سازی می باشند.

در گام نخست، از طریق تعامل میان نانوذرات طلا (AuNPs) و مولکولهای زیستی آنتی بادی، یک نانوکاوشگر (nanoprobe) طلا برای اندازه گیری الکتروشیمیایی غیرآنزیمی نشانگرها ساخته شد. این روش نه تنها متدی ساده برای بارگذاری حجم بالایی از آنتی بادی بر روی نانوذرات را فراهم آورد بلکه تا حد زیادی تکرارپذیری فرآیند تولید این کاوشگر را نیز بهبود بخشید. این نانوکاوشگر، به همراه یک الکترود یکبار مصرف، می تواند برای اندازه گیری الکتروشیمیایی یک یا چند نشانگر بکار برده شود. به عبارت دیگر، این نانوکاوشگر می تواند ابزاری (تک/ تسهیم شده) دقیق با توان بالا برای اندازه گیری غلظت های مختلف نشانگرهای مختلف ایجاد نماید.

گام بعدی نشاندن این کاوشگر بر روی سطح الکترود با حفظ ساختار و کارکرد آنتی بادی موجود در آن بود. در این راستا، رسوب نانوذرات طلا بر روی سطح الکترود طلا به منظور بهبود ویژگی های الکتروشیمیایی سطح صورت گرفت. به عبارت دیگر، نسبت بالاتر سیگنال به نویز بدنبال نشاندن AuNP فرآیند کوچک سازی سیستم را بهبود بخشیده و از طرف دیگر با افزایش سطح باعث تقویت سیگنال پاسخ می شود. مرور مطالعات نشان داد که نشاندن طلا برروی الکترود طلا به روشهای مختلف امکان پذیر است و به همین دلیل در این پروژه روشهای رسوب لایه به لایه (LBL)، روش خود مونتاژ تک لایه (SAM) و آبکاری مقایسه شدند. نتایج نشان داد که آبکاری AuNPs به روش ولتامتری باعث افزایش قابل مشاهده در پیک جریان شده و بدین ترتیب کینتیک الکترود را بهبود می بخشد. الکترودهای اصلاح شده به این روش همچنین پایداری و تکرارپذیری بیشتری را از خود نشان دادند.

استئوکلسین (Oc) و کلاژن کراس لینک C ـ تلوپپتید نوع ۱ (CTX) بواسطه پیوند کووالانسی و از طریق کراس لینکرها برروی الکترودهای طلای اصلاح شده با AuNP نشانده شدند و غلظتهای مختلف آنتی ژن های مربوطه توسط آنها اندازه گیری شد.

امروزه استفاده از فن آوری میکروسیالی در ساخت دستگاه های تشخیصی نقطه مراقبت و برای مبارزه با مسائل بهداشت جهانی به طور گسترده ای در حال توسعه می باشد. این به دلیل مزایای بالقوه این سیستمها شامل نیاز به حجم کم نمونه و معرف، توان و حساسیت بالا، نسبت بالای سطح به حجم، و همچنین توانایی کوچک سازی می باشد. به همین دلیل در این پروژه تصمیم به ادغام تراشه الکتروشیمیایی با سیستم میکروسیالی شد. ساخت کانالهای میکروسیالی معمولا پرهزینه بوده و نیاز به فرآیندهای پاکسازی متعدد در آزمایشگاه، لیتوگرافی نوری، قلم زنی و یا پخت در محیط های اتاق تمیز داشته و به همین دلیل اصلاح و یا تغییر طرح معمولا دشوار می باشد. علاوه بر این، بستن مناسب محوطه کانال بدون تغییر طرحهای کوچک و یا انسداد کانال در حین فرایند اتصال چالش برانگیز است. بنابراین ما از یک روش ارزان، قابل اعتماد و سریع برای ساخت کانال میکروسیالی با استفاده از نوارچسب دو طرفه بهره جستیم. با کمک این روش نه تنها ساخت کانال با ابعاد مقطعی یکنواخت بلکه امکان ایجاد سیستم های ترکیبی، متشکل از لایه های مختلف، با توجه به چسبندگی مناسب بین لایه ها امکان پذیر بود.

در مرحله آخر سنسور الکتروشیمیایی و تراشه های میکروسیالی برای ساخت سیستم استئوکیت ادغام شدند. در این پلت فرم مبتنی بر واکنش آنتی بادی و آنتی ژن کلیه مراحل معرفی نمونه، انکوباسیون و اندازه گیری الکتروشیمیایی در کانالهای میکروسیالی اتفاق می افتاد. الکترودهای طلای موجود در محفظه میکروسیالی برای نشاندن آنتی بادیهایی که در مراحل بعدی بصورت انتخابی با آنتی ژن مربوطه واکنش می دادند عاملدار شده بودند. روش کرونوآمپرومتری در دمای اتاق برای اندازه گیری غلظت محلول آنتی ژن استفاده شد.

نتایج نهایی نشان داد که استئوکیت دقت، حساسیت و اختصاصی بودن لازم برای سنجش سطح سرمی استئوکلسین و CTX را دارد. حد پایین تشخیص برای استئوکلسین ng/mL ۱/۹۴ و برای CTX معادل pg/mL ۲/۷۷ بود. این دستگاه همچنین برای اندازه گیری سطح سرمی نشانگرهای Oc و CTX مورد استفاده قرار گرفت و نتایج با مقادیر حاصله از ECLIA مقایسه شد. این نتایج حاکی از تطابق قابل قبول میان نتایج داشت.

سنسور ساخته شده برای اندازه گیری غلظت Oc سرمی حساس و اختصاصی بوده و می تواند سطح سرمی نشانگر را در طیف وسیعی از ۲/۵ تا ۷۵ نانوگرم/میلی لیتر تشخیص دهد که با توجه به مرجع نرمال این نشانگر (۹ تا۴۲ نانوگرم/میلی لیتر) قابل قبول است. به طور مشابه، سطح CTX با موفقیت از ۱ تا۲۵۰۰

pg/mL قابل اندازه گیری بود که با توجه به مرجع نرمال نشانگر (۵۰ تا۴۵۰ pg/mL) قابل قبول است. از طرف دیگر، سنسور ساخته شده هیچ واکنش متقاطعی برای سایر نشانگرها (کراس لپ بتا و هورمون پاراتیروئید برای سنسور Oc و استئوکلسین و هورمون پاراتیروئید برای سنسور CTX) نشان ندادند. ارتباط قابل قبول میان نتایج ECLIA و هر دو نشانگر Oc و CTX برروی سرم خون بیماران نشان داد که سنسور ساخته شده قابلیت اندازه گیری سطح سرمی نشانگرها در محدوده بالینی را داشته و سایر مولکولهای موجود در سرم، در نتایج تغییر قابل ملاحظه ای ایجاد نمی کنند. با این حال، این واقعیت که آنتی ژن استئوکلسین مورد استفاده برای رسم منحنی کالیبراسیون در واقع پپتید کامل انسانی بود، در حالی که کیتهای ECLIA برای اندازه گیری زنجیره میانی Oc طراحی شده ممکن است نتایج ما را تحت تاثیر قرار داده باشد.

می توان نتیجه گرفت که در مقایسه با روش های مرسوم، سنسور الکتروشیمیایی ساخته شده برای اندازه گیری نشانگرهای پیشنهاد شدی انتخابی و حساس بوده و از دیگر مزایای این سیستم تشخیصی ساده می توان به کاهش زمان اندازه گیری و نیاز به مقدار کمتر نمونه و ثبات بالا اشاره نمود.

نتایج نشان دهنده دقت، حساسیت، اختصاصی بودن و ثبات تراشه الکتروشیمیایی ساخته شده با این روش و در نتیجه امکان استفاده از آن برای برنامه های کاربردی بالینی در آینده بود. کل مدت اندازه گیری برای این سنسور (شامل بارگذاری آنتی ژن، انکوباسیون، شستشو و اندازه گیری غلظت) حدود ۱۰ دقیقه است، این در حالی است که ECLIA به زمان بیشتری برای این اندازه گیری نیاز دارد.

با توجه به مطالعات ما، این اولین دستگاه میکروسیالی ساخته شده برای اندازه گیری BTM می باشد. همچنین نتایج موجود نشان دهنده حساسیت قابل قبول استئوکیت برای اندازه گیری این نشانگرها در مقایسه با روشهای مرسوم مورد استفاده یعنیELISA و الکتروکمیلومینسانس می باشد. در این کار، تنها دو BTM مورد مطالعه قرار گرفتند اما سیستم ساخته شده قابلیت استفاده برای اندازه گیری سایر نشانگرهای زیستی را نیز دارا می باشد. این نتایج نیاز به اعتبار بخشی داشته اما نشان می دهد که سیستم ساخته شده همراستا با تحقیقات در ساخت دستگاه های تشخیصی برای بیومارکرها می باشد.

Samenvatting

Diagnose van osteoporose wordt hedendaags gedaan op basis van metingen van de mineraaldichtheid van beenderen “bone mineral density“ (BMD), deze methode heeft echter beperkingen. Er wordt aangenomen dat “bone turnover markers“ (BTM) kunnen helpen bij het detecteren van osteoporose. Hoewel het gebruik van BTMs in het diagnosticeren van osteoporose verschillende voordelen heeft over BMD, niet alleen in het monitoren van de behandeling maar ook in het identificeren van risico?s, blijft de diagnostische waarde in het voorspellen van osteoporose laag, en dus worden er verschillende BTMs gebruikt op hetzelfde moment wat leidt tot een hogere nauwkeurigheid en een lagere variantie om deze limitatie te overwinnen.
Ondanks recente vooruitgang in proteomics en gepersonaliseerde geneeskunde blijven beschikbare technologieën voor BTM metingen, namelijk enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) en elektrochemiluminescentie (ECLIA), tijdrovend en arbeidsintensief, ze vereisen ook speciale labels, dure instrumenten. Met deze duidelijke beperkingen, is de focus van gezondheid gerelateerde studies verschoven naar de ontwikkeling van draagbare, herbruikbare en multiplex, vrij van labels, Point-of-Care (POC) biosensoren vooral voor het diagnosticeren en monitoren van verscheidene ziektes.
Er is dus een groeiende vraag naar het ontwikkelen van verschillende types biosensoren die geminiaturiseerde platformen aanbieden om het remodelleringsproces van beenderen beter weer te geven. Voor zover wij weten, is er geen enkele bestaande biosensor die slaagt op dit vlak.
Een efficiënte biosensor is sterk afhankelijk van selectieve binding van het herkenningselement met de doel analyten en de transducer voor het signaleren van de binding in termen van responsietijd, signaal-ruisverhouding “signal-to-noise ratio“ (S/N) en detectiegrenzen “limits of detection“ (LOD).
In deze studie, melden wij een microfluïdisch proteomics platform dat gemakkelijk gebruikt kan worden voor de diagnose van biomarkers. Dit platform integreert microfluïdische technologie met elektrochemische detectie en belichaamt een reactie/detectie kamer die serumniveaus van verschillende biomarkers kan opmeten. Het unieke ontwerp van dit platform biedt de mogelijkheid voor grotere gevoeligheid omdat zowel de microfluïdische als elektrochemische structuren onafhankelijk van elkaar geoptimaliseerd kunnen worden.
Als eerste stap, door de inherente interactie tussen gouden nanodeeltjes (AuNPs)

en antilichamen, werd een nieuwe gouden nanoprobe ontwikkeld voor gebruik in niet-enzymatische elektrochemische immuno-assays. Deze één-pot methode biedt niet alleen een eenvoudige methode voor het voorzien van een hooge gehalte van antilichaamen aan de nanodeeltjes maar verbeterd ook aanzienlijk de herhaalbaarheid en controleerbaarheid van de nanoprobe voorbereiding. Met andere woorden, door het gebruiken van deze nanoprobe kan een hoge throughput methode (single/multiplex sensors) ontwikkeld worden om verschillende en grote hoeveelheden keuze markers te screenen.
De volgende stap was de immobilisatie van de probe op het elektrodeoppervlak met behoud van zowel de structuur en functionaliteit van de antilichamen. De afzetting van gouden nanodeeltjes (AuNPs) op het oppervlak van de gouden electrode zorgt voor betere elektrochemische eigenschappen van het oppervlak. Met andere woorden, de hoge signaal-ruisverhouding verbeterd de miniaturisatie van de sensor-elementen, terwijl het oppervlak, dat hoge specificiteit vertoont, ideaal is om het signaal antwoord te versterken. Volgens bestaande literatuur kan dit gebeuren op verscheidene manieren. Wij vergeleken de laag per laag "layer-by-layer" depositie, self-assembled monolayer techniek en elektrodepositie methoden. Onze resultaten toonden aan dat cyclische voltammetrie elektrodepositie van AuNPs zorgen voor een observeerbare toename in de piekstroom, waardoor de elektrode-kinetiek verbeterd. Deze gemodificeerde elektroden toonde ook een aantal voordelen met betrekking tot stabiliteit en reproduceerbaarheid.
Osteocalcine (Oc) en collageen type 1 cross-linked C-telopeptide (CTX) werden vervolgens covalent geïmmobiliseerd op de AuNP gemodificeerde gouden elektrodes door crosslinkers en verschillende concentraties van overeenkomstig antigeen werden aangebracht voor directe bepaling.
Tegenwoordig worden microfluïdische technologieën op grote schaal gebruikt in het ontwikkelen van point-of-care diagnostiek om globale gezondheidsaspecten aan te kaarten omwille van hun potentiële voordelen van lage sample en reagens consumptie, hoge throughput en gevoeligheid, groot oppervlak-volume ratio en andere voordelen gerelateerd met miniaturisatie. Om deze redenen besloten wij onze elektrochemische chip te integreren in een microfluidïsch systeem. Het maken van microfluidïsche kanalen is meestal kostelijk en vergt laboratium-intensieve schoonmaking, fotolithographie en etching of baking stappen in cleanroom omgeving, wat het moeilijk maakt om dit proces te modificeren. Ook is het voldoende insluiten van de kanalen zonder het vervormen van de kleinere features of zonder het verstoppen van de kanalen gedurende het bonding proces een hele uitdaging. Daarom hebben wij een goedkope, betrouwbare en snelle methode ontworpen om microfluidïsche kanalen te maken gebruik makend van dubbelzijdige tapes, wat het mogelijk maakt om niet alleen de doorsnede hoog uniform te houden over het gehele kanaal maar ook voldoende hechting geeft voor hybride systemen, bestaande uit verschillende lagen.
Daarna werden de elektrochemische sensor en de microfluidïsche chips geïntegreerd om een osteokit systeem te ontwikkelen. De sensing-interface fabrica-

tie, sample incubatie en elektrochemische detectie in dit antilichaam-antigeen-gebaseerd platform zijn allemaal uitgevoerd d.m.v. het gebruik van microfluidïsche kanalen. Microgefrabiceerde Au electrodes, die in een microfluidïsche kamer waren ingebracht, werden gefunctionaliseerd om antilichamen te immobiliseren, die op hun beurt selectief de overeenkomstige antigenen vastleggen. Chronoamperometrische technieken op kamertemperatuur werden gebruikt om de concentratie van antigeen-oplossingen op te meten. De omvang van de respons stroom varieerde lineair met de logaritmische concentratie van de relatieve biomarker, en werd dus gebruikt om de concentratie van de relatieve biomarker in de serum samples te kwantificeren.
We hebben de implementatie, haalbaarheid en specificiteit van dit platform (Osteokit) aangetoond door het meten van serum niveaus van osteocalcin en CTX. De detectie limiet van osteocalcin was 1.94 ng/mL, waar die van CTX 2.77 ρg/mL was. Het toestel werd ook gebruikt om de serum niveaus van Oc en CTX op te meten en de resultaten werden vergeleken met dat van ECLIA, waarvan het resultaat aanvaardbare gelijkenis toonde.
De ontwikkelde sensor was gevoelig en specifiek voor serum Oc en kan serumniveaus van de marker detectereen in een bereik van 2.5 tot 100 ng/mL. De normale referentie van de marker is 9 tot 42 ng/mL, wat suggereert dat de sensor OC kan detecteren. Op een gelijkaardige manier als hierboven beschreven werden CTX niveaus succesvol gemeten in een bereik van 1 tot 2500 ρg/mL. Dit is terwijl de normale referentie van de marker 50 tot 450 ρg/mL is, wat aantoont dat de sensor CTX op een acceptabele manier kan detecteren.
Onze sensor vertoonde geen kruisreactiviteit voor andere biomarkers (voor b-CrossLaps en parathyroïd hormoon (PTH) in Oc sensor en voor osteocalcine en PTH in CTX sensor). De goede correlatie tussen ECLIA en Osteokit toont aan dat onze sensor gebruikt kan worden in een klinisch relevant bereik en dat andere macromolecules in het serum onze resultaten niet verstoren. Het feit dat osteocalcin antigeen, dat gebruikt werd om onze calibratie curve op te stellen, een volle lengte proteïne is, terwijl ECLIA ontwikkeld werd om N-mid Oc op te meten, kan onze resultaten beïnvloed hebben.
De ontwikkelde elektrochemische chips toonden hoge gevoeligheid, specificiteit, stabiliteit en betrouwbaarheid, wat veelbelovend is voor klinische toepassingen. De totale responsietijd van de sensor is ongeveer 10 minuten (belading van antigeen, incubatietijd, spoelen met PBS en testen), terwijl ECLIA enkele uren duurt. Er werd geconcludeerd dat in vergelijking met conventionele methodes de elektrochemische sensor de voorgestelde marker kan detecteren met hoge selectiviteit, gevoeligheid, gereduceerde interferentie, korte meet-tijd, nood aan minder samples en een beter stabiliteit in een eenvoudig detectie systeem.
Voor zover wij weten, is dit het eerste toestel dat gefabriceerd werd om BTMs te meten. Onze resultaten toonden aan dat de gevoeligheid van Osteokit vergelijkbaar zijn met de “state-of-art“-methodes van dit moment, ELISA en elektrochemiluminescentie. Slechts twee belangrijke BTMs zijn onderzocht in deze studie,

maar het detectie systeem kan gemakkelijk aangepast worden voor andere biomarkers in de toekomst. Deze resultaten hebben verdere validatie nodig maar kunnen wijzen op de richting waarin het veld van de diagnostische biomarkers evolueert.

Summary

Osteoporosis diagnosis, which is nowadays generally made based on bone mineral density (BMD) measurements, suffers from certain limitations. Thus it is believed that bone turnover markers (BTMs) can help improve osteoporosis detection. While the use of BTMs in osteoporosis diagnosis has certain advantages over BMD and clinical risk assessment tools, not only in monitoring treatment but also in identifying those at-risk, the diagnostic value of BTMs in predicting osteoporosis is low, and thus several BTMs are used at the same time with higher accuracy and lower variability to overcome this limitation.

Despite recent advancements in proteomics and personalized medicine, available technologies for BTM measurement, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) and electrochemiluminescence (ECLIA), are time consuming, laborious, require special labels and expensive instruments. With these apparent limitations, the focus of health-related studies has shifted towards the development of portable, reusable and at the same time multiplex, label-free Point-of-Care (POC) biosensors particularly for diagnosis and monitoring of different diseases. Also known as on-the-spot diagnostic devices, these POC biosensors should be simple, sensitive, rapid, specific, cheap, and easy to interpret.

Thus, there is a growing demand to fabricate different types of biosensors to provide low cost miniaturized platforms to assess bone remodeling process more accurately. To our knowledge, none of the existing bone biosensors have succeeded in this regard.

An efficient biosensor relies heavily on selective/specific binding of the recognition element with the target analytes as well as the transducer for signaling the binding event in terms of response time, signal-to-noise (S/N) ratio, and limits of detection (LOD).

In this work, we report a microfluidic proteomic platform that can easily be translated into a biomarker diagnostic. This platform integrates microfluidic technology with electrochemical sensing and embodies a reaction/detection chamber to measure serum levels of different biomarkers. The unique design of the platform offers the potential for greater sensitivity as the microfluidic and electrochemical structures can be independently optimized.

As the first step, through the inherent interaction between gold nanoparticles (AuNPs) and antibody biomolecules, a novel gold nanoprobe was developed to be used in the non-enzymatic electrochemical immunoassay. This one-pot

method not only provides a simple method for loading high-content antibody on nanoparticles but also greatly improves the repeatability and controllability of the nanoprobe preparation. Combined with a disposable electrode, it could be used for a single/multiplexed electrochemical immunosensing method. In other words, using this nanoprobe, high throughput instrumentation applying (single/multiplexed sensors) could be developed to screen a variety and vast quantities of samples for choice markers.
The next step was the immobilization of this probe on the electrode surface while saving the structure and functionalization of the antibodies. The deposition of gold nanoparticles (AuNPs) on the surface of gold electrode is believed to enhance the electrochemical characteristics of the surface. In other words, their high signal to noise ratio improves miniaturization of the sensor elements, whereas their high surface area makes them ideal for amplifying the signal response. According to the existing literature, this could be performed in various ways. We thus compared the layer-by-layer deposition, self-assembled monolayer technique and electrodeposition methods. Our results showed that cyclic voltammetry electrodeposition of AuNPs causes an observable increase in the peak current, causing improved electrode kinetics. These modified electrodes also showed several advantages with respect to stability and reproducibility.
Osteocalcin (Oc) and collagen type 1 cross-linked C-telopeptide (CTX) were then covalently immobilized on the AuNP-modified gold electrodes by cross linkers and different concentrations of corresponding antigens were applied for direct determination.
As nowadays, microfluidic technologies are widely employed in developing point-of-care diagnostics to address global health issues because of their potential advantages of low sample and reagent consumption, high throughput and sensitivity, large surface-to-volume ratio, and other benefits related to miniaturization, we decided to integrate our electrochemical chip into a microfluidic system. The fabrication of microfluidic channels is commonly costly and requires laboratory-intensive cleaning, photolithography, and etching or baking steps in cleanroom environments, making it difficult to modify. Besides, proper channel enclosure without deforming small features or without clogging of the channel during the bonding process is challenging. We therefore developed a cheap, reliable and rapid method for the fabrication of microfluidic channels using double-sided tapes, enabling not only highly uniform cross-sectional dimensions along the channels but also proper adhesion in hybrid systems, composed of different layers.
As the last step, the electrochemical sensor and the microfluidic chips were integrated to develop the Osteokit system. The sensing interface fabrication, sample incubation, and electrochemical detection in this antibody-antigen-based platform were all performed using microfluidic channels. Microfabricated Au electrodes encased in a microfluidic chamber were functionalized to immobilize the antibodies, which can selectively capture the corresponding antigen. Chronoam-

perometry technique at room temperature was used to measure the concentration of the antigen solutions. The magnitude of the response current varied linearly with the logarithmic concentration of the relative biomarker, and thus was used to quantify the concentration of the relative biomarker in serum samples.
We demonstrated the implementation, feasibility and specificity of this platform (Osteokit) in assaying serum levels of osteocalcin and CTX. The detection limit of osteocalcin was 1.94 ng/mL, whereas that of CTX was 2.77 ρg/mL. The device was also used to measure serum levels of the both Oc and CTX and the results were compared to that of ECLIA. The results of which showed acceptable concordance.
The developed sensor was sensitive and specific for serum Oc and could detect serum levels of the marker within the range of 2.5 - 100 ng/mL. This is while the normal reference of the marker is 9 - 42 ng/mL, suggesting that the sensor can acceptably detect Oc. Similarly, CTX levels were successfully measured from 1 - 2500 ρg/mL. This is while the normal reference of the marker is 50-450 ρg/mL, suggesting that the sensor can acceptably detect CTX.
Our sensor showed no cross-reactivity for other biomarkers (b-CrossLaps and parathyroid hormone (PTH) for Oc sensor and osteocalcin and PTH for CTX sensor). The good correlation between the ECLIA and Osteokit showed that they can be used in the clinically relevant range and other macromolecules available in serum do not affect our results. However, the fact that the osteocalcin antigen used to develop our calibration curve was a full-length protein, while ECLIA was designed to measure N-mid Oc may have affected our results.
The developed electrochemical chips showed ultrahigh sensitivity, specificity, stability and reliability, thus providing a highly promising potential for clinical applications. The total assay time for this sensor is about 10 min (loading of antigen, incubation time, flushing with PBS and testing), while ECLIA needs several hours to be performed.
It was concluded that compared to conventional methods, the proposed electrochemical sensor resulted in selective and sensitive measurement of the proposed BTM levels with reduced interference reactions, reduced measurement time, need for less amount of sample and better stability in a simplified detection system.
To our knowledge, this is the first such device fabricated to measure BTMs. Our results also showed the sensitivity of Osteokit to be comparable with the current state of art, ELISA and electrochemiluminescence. In this work, only two major BTMs were studied, but the assay system could easily be adapted to other biomarkers in future experiments. These results require further validation but may suggest a direction towards which the field of diagnostic biomarkers is moving.